

19



Europäisches Patentamt
Eur p an Patent Office
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

0 252 531
A1

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 87111726.3

51

Int. Cl.⁴: **C12N 15/00** ,
//G01N33/569,A61K39/245

22 Anmeldetag: 05.06.87

30 Priorität: 12.06.86 DE 3619718

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
13.01.88 Patentblatt 88/02

60 Veröffentlichungsnummer der früheren
Anmeldung nach Art. 76 EPÜ:

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)

72 Erfinder: **Jahn, Gerhard, Dr.**
Effeltrichersrasse 11
D-8524 Neunkirchen(DE)
Erfinder: **Scholl, Birgit-Christine**
Schlehenweg 4
D-8521 Uttenreuth(DE)
Erfinder: **Bröker, Michael, Dr.**
Lindenweg 16
D-3550 Marburg(DE)
Erfinder: **Mach, Michael, Dr.**
Geschwister-Scholl-Strasse 10
D-8520 Erlangen(DE)
Erfinder: **Fleckenstein, Bernard, Prof.**
Schlafhausen 93
D-8551 Hausen(DE)
Erfinder: **Traupe, Bernd**
Marquardstrasse 3D
D-8551 Hausen(DE)

74 Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.**
et al
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale
Patentabteilung Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

EP 0 252 531 A1

54 **Strukturelles Phosphoprotein (pp 150) des menschlichen Cytomegalovirus, seine Herstellung und Verwendung.**

57 Das phosphorylierte Strukturprotein vom Molekulargewicht etwa 150 kd (pp 150) des humanen Cytomegalovirus (HCMV) ist stark immunogen und wird zuverlässig von menschlichen Antisera erkannt. Dieses Protein kann - nach Zuordnung auf dem Genom von HCMV - gentechnisch ganz oder in immunogenen Teilbereichen hergestellt werden. Solche Proteine eignen sich als Reagens, beispielsweise im ELISA, und als Bestandteile von Impfstoffen.

Strukturelles Phosphoprotein (pp 150) des menschlichen Cytomegalovirus, seine Herstellung und Verwendung

Ein phosphoryliertes Strukturprotein von etwa 150 kd (pp 150) ist ein Bestandteil von gereinigten Virion-Partikeln. Nach W. Gibson, Virology 128 (1983) 391 - 406, ist es ein Konstituent der Matrix. Wegen seiner stark immunogenen Eigenschaften eignet es sich als Diagnostikum.

Die Erfindung betrifft pp 150 und immunogene Teile dieses Proteins, deren gentechnische Herstellung und ihre Verwendung als immunologisches Reagens, beispielsweise im ELISA. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung in ihren verschiedenen Aspekten werden im folgenden näher erläutert bzw. in den Patentansprüchen definiert.

Es wurde gefunden, daß man mit einem monospezifischen Kaninchen-Antiserum gegen pp 150 die gewünschten Klone aus einer HCMV-cDNA-Genbank identifizieren kann. Hierzu wurde eine Probe des gesamten viralen Proteins einer präparativen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und die einzelnen Proteinbanden mit Hilfe des Farbstoffs ©Coomassie (ICI) Brillant-Blau sichtbar gemacht. Das Protein mit dem Molekulargewicht 150 kd wurde herausgeschnitten, extrahiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Das gewonnene Antiserum zeigte im "Western Blot"-Test Reaktion mit dem 150 kd Protein. Dieses Serum wurde für das "Screening" der cDNA-Genbank eingesetzt.

Zur Herstellung der Genbank wurde aus mit HCMV, Stamm Ad 169, infizierten menschlichen Vorhaut-Fibroblastenzellen 96 bis 120 Stunden nach der Infektion die poly(A)⁺-RNA isoliert, in ds-DNA überführt und ohne Größenfraktionierung in den handelsüblichen Phagen-Expressionsvektor λgt11 eingefügt. Hierzu wurde der Vektor mit EcoRI gespalten und mit alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm) behandelt, um die intramolekulare Religation zu unterdrücken. Durch Anfügen von EcoRI-Linkern wurde die cDNA zwischen die Phagenarme eingefügt und in vitro verpackt. Aus 100 ng ds-cDNA wurde so eine Genbank erhalten, die etwa 5•10⁵ unabhängige Rekombinanten und 18 % Wildtyp-Phagen enthielt.

Das "Screening" der Genbank erfolgte nach der Methode von R. A. Young und R. W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 1194 - 1198, jedoch mit der Abwandlung, daß Meerrettich-Peroxidase an Protein A gekoppelt wurde und 4-Chlor-1-naphthol als Detektionssystem diente, unter Einsatz der vorstehend beschriebenen monospezifischen Kaninchen-Antikörper. Bei diesem "Immunoscreening" werden die auf Nitrozilulosefiltern vorhandenen Kolonien vorsichtig lysiert, mit oben beschriebenen monospezifischen Kaninchen-

Antikörpern inkubiert und nach Entfernen ungebundener Reaktanden positive Plaques mit dem genannten modifizierten Detektionssystem nachgewiesen.

Von 150 000 untersuchten Plaques wurden 8 positive Signale erhalten. Ein Klon mit einer Insertion von etwa 300 Basen wurde für die weitere Charakterisierung ausgewählt; er erhielt die Bezeichnung BB 8.

Der E. coli-Stamm Y 1089 wurde mit dem rekombinanten Phagen infiziert und die Synthese des β-Galactosidase-Proteins durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Hierbei wurde ein Fusions-Protein gebildet, das deutlich größer als die Galactosidase (118 kd) ist. Es wird weder in nichtinfizierten Zellen noch in infizierten, aber nichtinduzierten Zellen gefunden. Sowohl menschliche HCMV-positive Seren als auch das Kaninchen-Anti-pp 150-Serum reagierten nur mit diesem Protein in BB 8-infizierten, induzierten Zellen, erkannten jedoch weder Proteine in nichtinfizierten oder nichtinduzierten infizierten Zellen. Es ergibt sich somit, daß der rekombinante Klon BB 8 ein Fusionsprotein mit einem HCMV-Protein-Anteil synthetisiert.

Mit dem Fusionsprotein aus BB 8 wurde ein Kaninchen immunisiert und mit dem Antiserum wurden "Western Blot"-Analysen mit HCMV-Proteinen durchgeführt. Es reagierte nur das pp 150.

Die cDNA-Insertion von 300 bp wurde nun verwendet, um das Gen für pp 150 im Virus-Genom zu lokalisieren: Hierfür wurde die cDNA-Insertion von 300 bp mit 8 Cosmid-Klonen hybridisiert, die das gesamte Genom von HCMV umspannen (B. Fleckenstein et al., Gene 18 (1982) 39 - 46). Die Cosmide pCM 1015 und pCM 1017, die überlappend die HindIII-J-, -N- und Y-Fragmente enthalten, hybridisierten mit der cDNA. Eine eingehendere "Southern Blot"-Analyse dieser Region begrenzte das HCMV-DNA-Fragment auf ein 1,5 kb EcoRI-PstI-Fragment, das im EcoRI-Y-Fragment lokalisiert ist, und zwar benachbart zum C-Fragment.

"Northern Blot"-Analysen mit "später" RNA und ³²P-markierter DNA des Klones BB 8 (in M13 umklont) ergaben ein abundantes Transkript von 6,2 kb.

"Northern Blot"-Analysen mit unterschiedlich klonierten viralen DNA-Fragmenten aus dem HindIII-J- und -N-Fragment ergaben verschiedene Größenklassen von "später" RNA. Das stärkste Signal ergab sich mit einer RNA-Größenklasse von 6,2 kb.

Von allen untersuchten Strukturproteinen wurde pp 150 in "Western blot"-Analysen am zuverlässigsten von menschlichen HCMV-positiven Seren erkannt. Dabei reagieren sowohl IgM-positive als auch IgG-positive Seren von unterschiedlichsten Patienten, beispielsweise kongenital infizierten Kindern, AIDS-erkrankten u.a. symptomatischen und asymptomatischen Personen.

Da pp 150 in den Mengen, die für Diagnostika erforderlich sind, nur unter großem technischem Aufwand zu isolieren wäre, ist die erfindungsgemäße gentechnische Herstellungsweise besonders vorteilhaft. Es zeigte sich, daß nicht nur von eukaryotischen Zellen exprimierte Produkte antigen wirken, sondern auch Expressionsprodukte von Bakterien. Da Bakterien keine Phosphoproteine erzeugen, war nicht zu erwarten, daß auch bakteriell hergestelltes HCMV-pp 150 oder Teile davon stark immunogen wirken. Es zeigte sich jedoch, daß auch solche Proteine von entsprechenden Seren ebenso eindeutig erkannt werden wie authentisches pp 150.

Erfindungsgemäß kann somit in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen, beispielsweise Hefezellen, menschlichen oder animalen Zellen, hergestelltes pp 150 oder immunogene Teile davon als Reagens für einen HCMV-Antikörperrnachweis verwendet werden, beispielsweise im ELISA.

Beispiel

Das XhoI-PstI-Fragment, das innerhalb des HCMV-EcoRI-Y Fragmentes liegt und somit für Teile des pp 150 codiert, wurde in den Expressionsvektor pBD 2 (M. Bröker, Gene Anal. Techn. 3 (1986) 53 - 57) ligiert, nachdem der Vektor mit BamHI und PstI gespalten worden war.

Nach Transformation des erhaltenen Hybridplasmids in E. coli BMH 71-18 wurden Klone isoliert, deren Plasmid-DNA das zu erwartende Restriktionsmuster besaßen. Nach Induktion des lac-Promotors mit Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid (IPTG) exprimierten die Klone große Mengen eines Fusionsproteins mit einem pp 150-Anteil.

In "Western blot"-Analysen wurde das rekombinante Fusionsprotein, nicht aber das durch pBD 2 codierte Kontrollprotein in allen getesteten HCMV-positiven humanen Seren ebenso eindeutig erkannt wie authentisches pp 150.

Das neue Plasmid, das für dieses β -Galactosidase-pp 150 Fusionsprotein codiert, wird im folgenden pXP1 genannt. Aus E. coli-Zellen, die den Vektor pXP1 enthalten, wurde nach Induktion mit IPTG, das durch pXP1 codierte Fusionsprotein isoliert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Serum, das nach dreimaliger Immunisie-

rung gewonnen worden war, reagierte in Western blot-Analysen mit Proteinbanden von ca. 150.000 d von HCMV infizierten Zellextrakten, nicht aber mit Kontrollextrakten. Somit sind Antikörper, die gegen das bakteriell synthetisierte pp 150 hergestellt worden sind, in der Lage, authentisches pp 150 zu erkennen. Ferner konnte das anti-pXP1-Serum dazu benutzt werden, bereits zwei bis drei Tage nach Infektion von Zellkulturen, HCMV mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen, während der cytopathische Effekt erst nach zehn bis vierzehn Tagen erkennbar wird. Somit kann ein Serum, das gegen rekombinant hergestelltes pp 150 gewonnen wurde, als diagnostisches Mittel eingesetzt werden.

Ansprüche

1. Strukturelles Phosphoprotein mit einem Molgewicht von etwa 150 kd (pp 150) aus humanem Cytomegalovirus (HCMV) und immunogene Teile davon, erhältlich durch Expression des Gens, das im Bereich der Fragmente HindIII-Y/N des Genomes von HCMV, Stamm Ad 169, liegt, oder Teilen dieses Gens.

2. pp 150 und immunogene Teile davon, erhalten durch Expression des Gens, das auf einem 1,5 kb EcoRI-PstI-Fragment innerhalb des EcoRI-Y-Fragments aus dem Genom von HCMV, Stamm Ad 169, liegt, oder Teilen dieses Gens.

3. Verfahren zur Herstellung von pp 150 oder immunogenen Teilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man das Gen ganz oder teilweise zur Expression bringt, das in dem offenen Leserahmen der HindIII-Y/N-Fragmente aus dem Genom von HCMV, Stamm Ad 169, liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man ein 1,5 kb EcoRI-PstI-Fragment aus dem EcoRI-Y-Fragment einsetzt.

5. Verwendung der Proteine nach Anspruch 1 bis 2 bzw. der nach Anspruch 3 bis 4 erhaltenen Proteine oder immunogenen Teile dieser Proteine als diagnostisches Mittel.

6. Verwendung der Proteine nach Anspruch 1 bis 2 bzw. der nach Anspruch 3 bis 4 erhaltenen Proteine oder immunogenen Teile dieser Proteine im ELISA-Test.

7. Verwendung der Proteine nach Anspruch 1 bis 2 bzw. der nach Anspruch 3 bis 4 erhaltenen Proteine oder immunogenen Teile dieser Proteine als Bestandteil eines Impfstoffes.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: GR; AT; ES

1. Verfahren zur Herstellung eines strukturellen Phosphoproteins mit einem Molgewicht von etwa 150 kd (pp150) aus humanem Cytomegalovirus

(HCMV) oder immunogenen T ilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man das Gen ganz oder teilweise zur Expression bringt, das in dem offenen Leserahmen der HindIII-Y/N-Fragmente aus dem Genom von HCMV, Stamm Ad 169, liegt.

5

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein 1,5 kb EcoRI-PstI-Fragment aus dem EcoRI-Y-Fragment einsetzt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
P, X	JOURNAL OF VIROLOGY, Band 61, Nr. 5, Mai 1987, Seiten 1358-1367, American Society for Microbiology; G. JAHN et al.: "Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus" * Insgesamt *	1-9	C 12 N 15/00 // G 01 N 33/569 A 61 K 39/245
D, A	--- VIROLOGY, Band 128, 1983, Seiten 391-406, Academic Press, Inc.; W. GIBSON: "Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses" * Seite 396, Tabelle 1; Seite 397, Spalte 2, Zeilen 4-23; Seite 398, Spalte 1, Zeilen 1-28 *	1	
A	--- VIROLOGY, Band 132, 1984, Seiten 325-338, Academic Press, Inc.; B. NOWAK et al.: "Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against human cytomegalovirus virion proteins" * Seite 331, Spalte 2, Zeilen 36-42; Seite 333, Tabelle 1; Seite 396, Spalte 2, Zeilen 36-41 *	1	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4) C 12 N A 61 K G 01 N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 04-10-1987	Prüfer SKELLY J.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien der Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE USA, Band 82, Februar 1985, Seiten 1266-1270; E.S. MOCARSKI et al.: "Precise localization of genes on large animal virus genomes: use of lambda phage 11 and monoclonal antibodies to map the gene for a cytomegalovirus protein family"		
D, A	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE USA, Band 80, März 1983, Seiten 1194-1198; R.A. YOUNG et al.: "Efficient isolation of genes by using antibody probes" -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 04-10-1987	Prüfer SKELLY J.M.
<p>EPA Form 1503 03/82</p> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A : technologischer Hintergrund</p> <p>O : nichtschriftlich Offenbarung</p> <p>P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			